蓖麻蚕中肠 γ-谷氨酰转肽酶和底物的相互作用及其生理功能*

林 浩 陈淡贞 尹 明 朱湘雄
（中国科学院上海昆虫研究所，上海）

摘要 蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 高度提纯的中肠 γ-谷氨酰转肽酶（γ-GTP）体外转肽作用表明：L-苯丙氨酸、L-甲硫氨酸、L-半胱氨酸、L-色氨酸、L-精氨酸和 L-赖氨酸是最好的 γ-谷氨酰的受体，而L-谷氨酸和 L-谷氨酰胺（L-Gln）系该酶良好的 γ-谷氨酰供体。酶对 γ-谷氨酰对硝基苯胺（γ-GNA）的 K_m 为 0.13mmol/L（含L-苯丙氨酸）和 0.29mmol/L（无L-苯丙氨酸）。谷胱甘肽（GSH）和 L-Gln 与 γ-GNA 竞争酶的 γ-谷氨酰结合部位，其抑制常数 K_i 值分别为 0.5mmol/L 和 1.1mmol/L。γ-GTP 催化 L-Gln 的酰胺键水解和转肽，其催化速率相当于对 γ-GNA 的 38%。

关键词 蓖麻蚕 γ-谷氨酰转肽酶 谷胱甘肽 谷氨酰胺

蚕体对氨基酸的吸收和传递机制可能是多种多样的，例如，可通过钠钾泵主动传送。从我们最近的研究结果看来，γ-谷氨酰循环可能是蚕体氨基酸主动传送的另一条重要途径。因为蚕体中肠、马氏管等主要组织均具有相当高活力的 γ-谷氨酰转肽酶（邹柏祥等，1986；林浩等，1987）、γ-谷氨酰环化转移酶（陶黎明，1986；许廷森等，1988）和 5-氧脯氨酸酶（彭金荣等，1990），并观察到 γ-谷氨酰-半胱氨酸合成酶的抑制剂在蚕体内抑制谷胱甘肽（GSH）的合成（高济宗等，1986）以及 20-羟基蜕皮酮在转录水平上诱导蚕体合成 GSH（林浩等，1986），这反映了蚕体具有 γ-谷氨酰循环的主要酶系。近十年来的大量研究已证实，该循环存在于哺乳动物的肝、肾和小肠中，确立了该循环具有多种重要生理功能（Meister 等，1983）。

蚕中肠是营养物质消化和吸收的重要场所，其 γ-谷氨酰转肽酶（γ-GTP）活力也最大。本文以蓖麻蚕中肠为材料，在分离纯化的基础上检测该酶活性中心的性质，以期进一步阐明该酶在蚕体 γ-谷氨酰循环中的作用及其生理功能。

材料与方法

一、材料

1. 蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* "朝白黄"品种，系广东省蚕种场提供。

2. 试剂 L-谷氨酸脱氢酶（L-GLDH），活力为 40 单位/毫克，还原型辅酶I（NADH），为 Sigma 产品；二异丙磷酰氟（DFP），为 ROTH 产品；γ-谷氨酰对硝基苯胺（γ-GNA）、谷胱甘肽（GSH）、ADP、各种氨基酸等有关试剂均为层析纯或分析纯。

本文于 1987 年 12 月收到。
* 国家自然科学基金资助课题。
本工作承许廷森先生帮助，广东省蚕种场提供蓖麻蚕，在此一并致谢。

3. γ-GTP 的制备　本文所用 γ-GTP 制剂系采用尹明等 (1988) 方法制备，经聚丙烯酰胺凝胶电泳和酶染色法鉴定，均达到显示一条带纯度。

4. γ-GTP 活力测定　参照林浩等 (1986) 方法，不同的是反应被乙酸终止后，直接于 380nm 波长测定对硝基苯胺的光吸收，利用消光系数 13500/mol/L/cm 计算酶活力。

5. 与 L-GLDH 偶联测定 γ-GTP 对 L-Gln 的活力　主要参考 Thompson 等(1977) 方法。反应液总体积 1.5 毫升，含 L-Gln 40 微克分子、NADH 0.75 微克分子、ADP 4 微克分子、α-酮戊二酸 (α-KG) 20 微克分子、L-GLDH 330 微克，适量的 γ-GTP 以及 Tris-HCl 缓冲液 (0.5mol/L)。反应系统 pH7.5。于 25℃ 反应，751 型分光光度计测定 A_{340} 的变化。用 NADH 的消光系数 6300/mol/L/cm 计算酶活力。所有试剂均用重蒸水配制，所用器皿高温消毒。

6. 蛋白测定　按 Lowry 等 (1951) 方法。

结　　果

一、γ-GTP 的 γ-谷氨酰受体部位对氨基酸的专一性

1. 各种 L-或 D-氨基酸对 γ-GTP 活力的影响

从表 1 可见，苯丙氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、精氨酸和赖氨酸是 γ-谷氨酰最好的受体，而谷氨酰胺、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸均抑制酶活力。这与大鼠肾 γ-GTP (Cook 等，1985；Tate 等，1974) 和家蝇 γ-GTP (Bodnaryk 等，1971) 不同，但与一种海产棘皮动物海盘车 (*Marthasterias glacialis*) 的 γ-GTP (Glynn 等，1985) 十分相似。

表 1　γ-GTP 与氨基酸的相互作用

氨基酸	相对活力		氨基酸	相对活力	
	浓度 (mmol/L)			浓度 (mmol/L)	
	18	36		18	36
—	100	100	脯氨酸	118	136
苯丙氨酸	195	235	丝氨酸	114	123
D-苯丙氨酸	未测	196	*酪氨酸	113	未测
甲硫氨酸	171	218	天冬酰胺	127	150
D-甲硫氨酸	未测	190	天冬氨酸	93	70
半胱氨酸	176	211	**谷氨酰胺	63	28
色氨酸	169	200	***谷氨酰胺	35	未测
精氨酸	173	198	谷氨酸	35	19
赖氨酸	167	195	丙氨酸	83	45
亮氨酸	143	160	甘氨酸	79	68
异亮氨酸	145	170	N-甲基-甘氨酸	未测	135
组氨酸	114	130	N-苯基-甘氨酸	未测	130
苏氨酸	135	150	双甘肽	未测	143
缬氨酸	117	127	甘氨酰-dl-苯丙氨酸	未测	130

注：表中氨基酸除特别注明外，其余均为 L-型
* 酪氨酸浓度为 1.4mmol/L
** 谷氨酰胺浓度分别为 9.2 和 18.4mmol/L
*** 谷氨酰胺浓度为 9.2mmol/L，苯丙氨酸浓度为 36mmol/L

D-苯丙氨酸和D-甲硫氨酸作为受体的效力与其相应的L-型对映体相当(表1)。这说明蚕体γ-GTP受体部位对氨基酸没有严格的L-立体专一性。这与家蝇和哺乳动物的γ-GTP不同，D-氨基酸不能充当γ-谷氨酰的受体（Bodnaryk 等，1971；Thompson 等(1977)；Cook 等，1985)。从表1还可看出,虽然甘氨酸对酶活力有一定的抑制，但N-甲基甘氨酸、N-苯基甘氨酸、双甘肽和甘氨酰-dl-苯丙氨酸均能促进酶活力。这可能说明氨基酸的游离α-氨基不是活力所必需的，二肽中含有好的氨基酸受体时，该二肽也是好的受体。

2. L-苯丙氨酸（L-Phe）浓度对γ-GTP活力的影响

图1显示出,酶活力随L-Phe浓度的增加而升高,浓度在0—15mmol/L之间基本上是线性关系。

此外，从γ-GNA/v对γ-GNA的图形中可看出，反应系统中加入L-Phe及不加入L-Phe时，所得结果为平行的二条线(图1 B)，这表明L-Phe和γ-GNA结合于γ-GTP活性中心的不同部位。

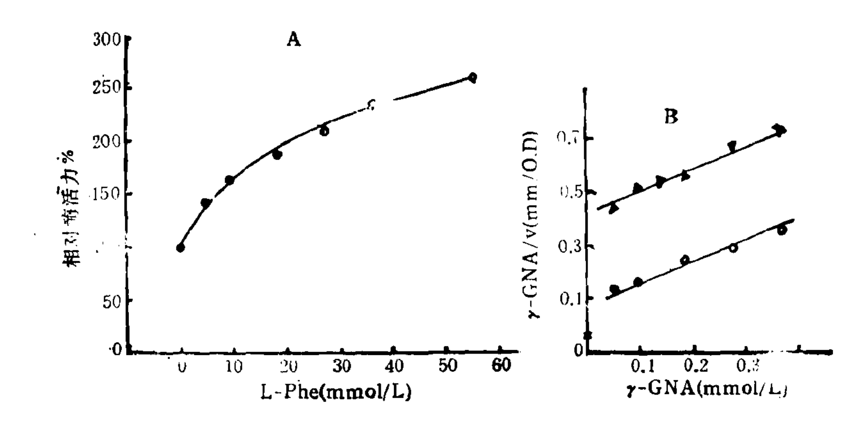


图1 γ-GTP与L-Phe的相互作用

A：γ-GTP活力与L-Phe浓度的关系 B：γ-GNA/v对γ-GNA作图

γ-GNA浓度为0.91mmol/L △—△ 无L-Phe，○—○ L-Phe浓度为36.0mmol/L

二、γ-GTP的γ-谷氨酰结合部位对底物的专一性

1. 对γ-GNA的K_m值和对GSH的K_i值

反应系统中γ-GNA的浓度0.055—0.55mmol/L，L-Phe的浓度为36mmol/L；另设含相应浓度的γ-GNA为对照。加入γ-GTP，于37℃反应5分钟,其余步骤见本文方法部分。

从双倒数图中(图2)，求得γ-GTP对γ-GNA的亲和力常数Km为0.13mmol/L,但反应系统中无L-Phe存在时，对γ-GNA的K_m值为0.29mmol/L；对GSH的解离常数(即抑制常数)K_i为0.5mmol/L。

2. γ-GTP与L-Gln的相互作用

(1) L-Gln对γ-GTP酶解γ-GNA的抑制性质

L-Gln对酶水解的抑制效力随其浓度的增加而增大，L-Phe存在时，L-Gln对酶活

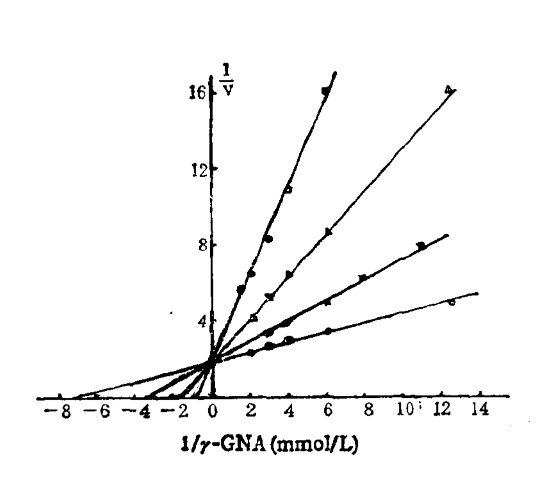


图 2　GSH 和 L-Gln 与 γ-GNA 竞争酶的结合部位
×—×不含 L-Phe 的 γ-GNA　●—●含 L-Phe 的 γ-GNA　△—△GSH，浓度为 1.4mmol/L　○—○ L-Gln，浓度为 8.3mmol/L

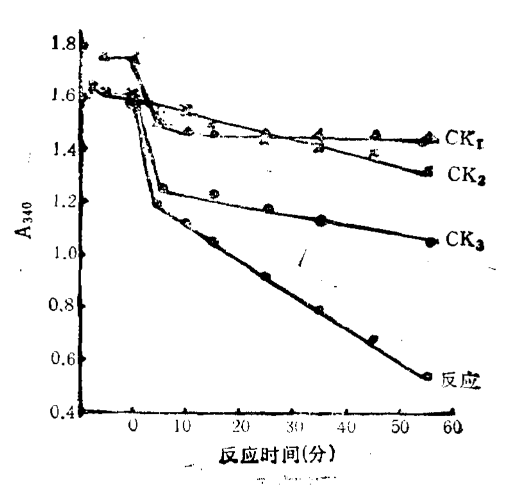


图 3　γ-GTP 催化 L-Gln 的水解
CK_1：含 γ-GTP 酶液，CK_2：含 L-Gln，CK_3：含 γ-GTP、L-Gln 和抑制剂，反应：含 γ-GTP、L-Gln

力的抑制增加约 1 倍(见表 1)。从图 2 看出，L-Gln 对 γ-GTP 的抑制是竞争性的，L-Gln 对酶的抑制常数 K_i 为 1.1mmol-L。

(2) 与 L-GLDH 偶联测定 γ-GTP 对 L-Gln 的活力

L-GLDH 催化的反应，强烈倾向于 L-Glu 的形成，反应系统中 NH_4^+ 的浓度即使低于 1μmol/L 也能酶促检出，其反应式如下：

$$\alpha\text{-KG} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{ADP, L-GLDH}} \text{L-Glu} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$$

从图 3 看出，当反应混合物(含 ADP、NADH、α-KG、Tris-HCl 缓冲液)在 L-GLDH 作用下，A_{340} 下降并到达平衡时，加入 γ-GTP 溶液后，A_{340} 下降并迅速到达稳定状态(即 CK_1)；在无 γ-GTP 存在下，加入 L-Gln 后，A_{340} 随着反应时间而缓慢下降(即 CK_2)；有 L-Gln 和 γ-GTP 的反应池中随着反应时间的延长，A_{340} 的下降明显大于 CK_1 与 CK_2 之和；当反应池中存在 γ-GTP 的强烈抑制剂硼酸钠和 L-丝氨酸(表 2)时，A_{340} 的下降相当于 $CK_1 + CK_2$ 之和(即 CK_3)。

从图 3 结果和 NADH 的消光系统计算出 γ-GTP 对 L-Gln 的酰胺键水解活力为 133.3 毫微克分子/分钟/毫克蛋白，这相当于在相同条件下(25℃，pH7.5，无 γ-谷氨酰受体存在下)γ-GTP 对 γ-GNA 活力(355.3 毫微克分子/分钟/毫克蛋白)的 37.5%。

3. 甘氨酸(Gly)对酶的抑制性质

虽然 Gly 与 L-Gln 和 L-Glu 相比，其对酶活力的抑制弱得多(见表 1)，但其抑制性质却与 L-Gln 一样是竞争性的(图未显示出)。酶对 Gly 的 K_i 值高达 21.5mmol/L，蚕体内不可能有这么高浓度的 Gly，因此对 γ-GTP 不可能产生体内抑制作用。

三、一些化合物对 γ-GTP 活性中心的影响

从表 2 看出，无 L-Met 存在下，除硼酸钠和 L-丝氨酸混合物对酶 100% 抑制外，其余因子均无明显影响；在有 L-Met 存在下，硼酸钠-丝氨酸混合物对酶仍 100% 抑制，镁离子部分促进酶活力，羟基抑制剂 DFP 和金属离子络合剂 EDTA 对酶部分抑制，巯基抑

表 2　一些化合物对 γ-GTP 活力的影响

化合物	浓度 mmol/L	相对酶活力 % L-甲硫氨酸 mmol/L 0	10
—	—	100	100
氯化镁	10.0	105	115
氯化锰	10.0	104	107
EDTA + 氯化镁	10.0	未测	70
EDTA	10.0	96	79
DFP	1.0	98	80
PCMB	1.0	99	104
硼酸钠 + L-丝氨酸	6+12	0	0

EDTA：乙二胺四乙酸二钠
PCMB：对氯汞苯甲酸
各化合物分别与酶预保温（37℃）5 分钟后，加入底物反应 5 分钟。

制剂 PCMB 对活力无影响。这些结果反映了游离的羟基和双价金属阳离子与酶的 γ-谷氨酰受体部位的活性有关。但游离巯基可能不是酶活性部位所必需的。

讨　论

根据前述 γ-GTP 的性质以及我们最近关于蚕体 γ-谷氨酰循环的研究，就蚕体 γ-GTP 可能的生理功能作如下讨论：

一、参与谷胱甘肽（GSH）的降解

家蚕与蓖麻蚕末龄幼虫中肠等组织的 GSH 浓度达 1—4mmol/L，而血淋巴和中肠内容物的 GSH 只有 0.02—0.08mmol/L（高济宗等，1986；林浩等，1987）。GSH 在蚕组织细胞内外的分布比例与哺乳动物的非常相似（Meister 等，1983）。蚕体 γ-GTP 对 γ-GNA 的 K_m 值为 0.13mmol/L，对 GSH 的 K_i 值为 0.5mmol/L（图 1）。哺乳动物 γ-GTP 对 γ-GNA 的 K_m 值在 0.01—0.90mmol/L，对 GSH 的 K_i 值为 0.26—1.1mmol/L（Tate 等，1974；Thompson 等，1977）。这显示了蚕体 γ-GTP 对底物的 γ-谷氨酰残基的亲和力和哺乳动物的相当。由于蚕体各组织 GSH 浓度比 γ-GTP 对 GSH 的解离常数 K_i 值高 1—7 倍，而血淋巴和消化内容物的 GSH 浓度比 K_i 值低一个数量级。因此只有各组织的 GSH 才能充当 γ-GTP 的生理底物，即细胞内的 GSH 被传递到细胞膜，在膜上与膜结合的 γ-GTP 反应，导致 GSH 的降解。这正好说明 5 龄期蚕体中肠组织 GSH 浓度与 γ-GTP 活力成反比的动态关系（林浩等，1987）。

二、参与 L-Gln 的水解和利用

蚕体 γ-GTP 与 L-Gln 相互作用，导致 L-Gln 的酰胺水解放出氨，同时发生转肽作用，其反应速率相当于以 γ-GNA 为底物时的 38%。这个相对速率比大鼠肾和家蝇 γ-GTP 的（2—10%）大得多（Tate 等，1975；Bodnaryk 等，1971）。

桑树等不同种类植物叶子含有高浓度的 L-Gln（Kondo, 1957）。蚕血淋巴中的浓度高达 5—8mmol/L（邹柏祥等，1979），比其 K_i 值高几倍，已足够充当蚕体各组织的 γ-

GTP 的生理底物。值得指出的是 L-Gln 是 NH_3 重要来源，5 龄期蚕粪便中 NH_3 含量约占排出总氮的 5—12%（许廷森等，1980）。由此看来，γ-GTP 对 L-Gln 的吸收、传递和代谢起着重要作用。

三、参与部分必需氨基酸的吸收和传递

L-Phe、L-Met、L-Cys、L-Trp、L-Arg、L-Lys 和 L-Leu，均是蚕 γ-GTP 良好的 γ-谷氨酰的受体(表 1)，反应系统中 L-Phe 在 5.0mmol/L 时，即发生明显的转肽作用(图 1 A)。实际上，在氨基酸受体存在下，γ-GTP 对 γ-谷氨酰供体的水解极大地被抑制，所测 γ-GTP 活力大部分是转肽作用的结果（Meister 等，1983)。家蚕和蓖麻蚕 5 龄期幼虫体液中 L-Phe、L-Lys、L-Leu、L-Thr、L-Arg 的浓度相当高，在 5—13mmol/L 之间(邹柏祥等，1979)，这已足够达到作为该酶天然底物的浓度。因此蚕体 γ-GTP 在不消耗能量的情况下，对中肠腔消化内容物和血液的上述几种氨基酸至少可部分地吸收和传递。

参　考　文　献

尹明、林浩、陈淡贞、陈燕翔　1988　蓖麻蚕中肠 γ-谷氨酰转肽酶的分离、纯化和性质。昆虫学研究集刊 **8**：87—94。上海科学技术出版社。

许廷森、朱菊红、林浩、邹柏祥　1980　精氨酸酶、鸟氨酸-δ 转氨酶和支链氨基酸转氨酶。昆虫学报 **23**(1)：1—8。

许廷森、邹柏祥、林浩　1988　家蚕和蓖麻蚕的 γ-谷氨酰环化转移酶的组织分布及其活性动态。蚕业科学 **14**(4)：210—4。

邹柏祥、张汉云、林浩、许廷森　1979　家蚕与蓖麻蚕的氨基酸和形成甘氨酸、丙氨酸的酶系比较及酮丙二酸的脱羧作用。昆虫学报 **22**(4)：378—89。

邹柏祥、林浩、许廷森　1986　蓖麻蚕 γ-谷氨酰转肽酶的研究。昆虫学报 **29**(1)：15—23。

林浩、陈淡贞、尹明、朱湘雄　1986　20-羟基蜕皮酮对蓖麻蚕 γ-谷氨酰转肽酶和谷胱甘肽的调节。昆虫学研究集刊 **6**：72—81。上海科学技术出版社。

林浩、邹柏祥、陈国瑚、庄大桓、项美华、许廷森　1987　家蚕 γ-谷氨酰转肽酶和谷胱甘肽的研究。蚕业科学 **13**(1)：35—9。

高济宗、许廷森　1986　蓖麻蚕和家蚕中的谷胱甘肽及正丁基高半胱氨酸亚砜亚胺对它的抑制作用。昆虫学报 **29**(3)：246—50。

陶黎明　1986　家蚕 γ-谷氨酰环化转移酶的纯化及其性质的研究。蚕业科学 **12**(3)：143—7。

彭金荣等　1990　家蚕中的 5-氧脯氨酸酶及保幼激素类似物对它的影响。昆虫学报 **33**(2)：143—8。

Bodnaryk, R. P. & Skillings, I. R. 1971 γ-Glutamyltranspeptidase catalyses the synthesis of γ-glutamylphenylalanine in the larva of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem.* **1**: 467—79.

Cook, N. D. & Peters, T. J. 1985 Purification of γ-glutamyltransferase by phenylboronate affinity chromatography. Studies on the acceptor specificity of transpeptidation by rat kidney γ-glutamyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta.* **828**: 205—12.

Glynn, B. P. & Johson, D. B. 1985 γ-Glutamyltranspeptidase from *Marthasterias glacialis*: Purification procedure and enzyme characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**(4): 941—8.

Kondo, Y. 1957 On the free amino acids in mulberry leaves, *Morus multicanlis*. *J. Sericalt. Sci. Japan.* **2b**: 349.

Meister, A. & Anderson, M. E. 1983 Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711—60.

Tate, S. S. & Meister, A. 1974 Interaction of γ-glutamyltranspeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogues of glutathione. *J. Biol. Chem.* **249**: 7593—602.

Tate, S. S. & Meister, A. 1975 Identity of maleate-stimulated glutaminase with γ-glutamyltranspeptidase in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **250**: 4619—27.

Thompson, G. A. & Meister, A. 1977 Interationships between the binding sites for amino acids, dipeptides, and γ-glutamyl donors in γ-glutamyl transpeptidase. *J. Biol. Chem.* **252**(19): 6792—8.

INTERACTION OF γ-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE FROM ERI-SILKWORM MID-GUT WITH DIFFERENT SUBSTRATES AND ITS POSSIBLE PHYSIOLOGICAL ROLE

LIN HAO CHEN DAN-ZHEN YIN MING ZHU XIANG-XIONG

(*Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai*)

The highly purified γ-glutamyltranspeptidase preparation from the mid-gut of eri-silkworm *Philosamia cynthia ricini* was examined with respect to its specificty toward different γ-glutamyl donors and acceptors. Of the 20 amino acids tested, phenylalanine, methionine, cystine, tryptophene, arginine and lysine were the best acceptors of the γ-glutamyl group, whereas glutamine and glutamate bound effectively to the γ-glutamyl binding site. The K_m values for γ-glutamyl-p-nitroaniline are 0.13 mmol/L with phenylalanine and 0.29 mmol/L without phenylalanine. The competitive inhibition constant K_i values for glutathione and glutamine are 0.5 and 1.1 mmol/L respectively in the presence of phenylalanine. The enzyme catalyzes the utilization of glutamine by conversion to glutamate, ammonia and γ-glutamyl-L-amino acids at about 38% of the rate observed for catalysis of releasing p-nitroaniline from γ-glutamyl-p-nitroaniline. The participation of the enzyme in the absorption and transportation of some indispensable amino acids in the mid-gut of the silkworm is discussed.

Key words *Philosamia cynthia ricini*——γ-glutamyltranspeptidase——glutathione——glutamine